



Funktionelle fibriller som depotmedicin mod prostatakræft

Jensen, Minna Grønning; van Maarschalkerweerd, Andreas; Gottschalk, Tine

Published in:
Lægemiddelforskning

Publication date:
2011

Document version
Tidlig version også kaldet pre-print

Citation for published version (APA):
Jensen, M. G., van Maarschalkerweerd, A., & Gottschalk, T. (2011). Funktionelle fibriller som depotmedicin mod prostatakræft. *Lægemiddelforskning*, 2011, 20-22.

Funktionelle fibriller som depotmedicin mod prostatakræft

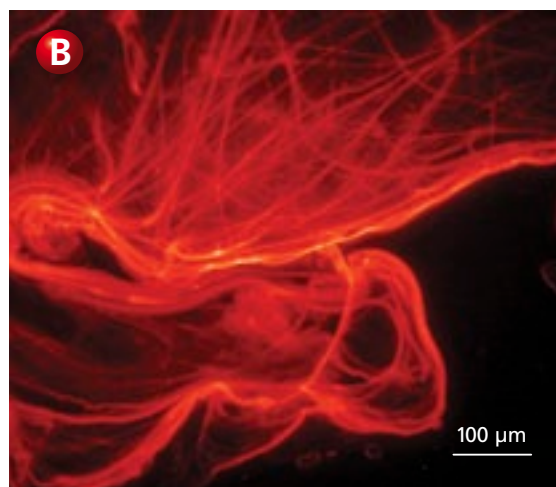
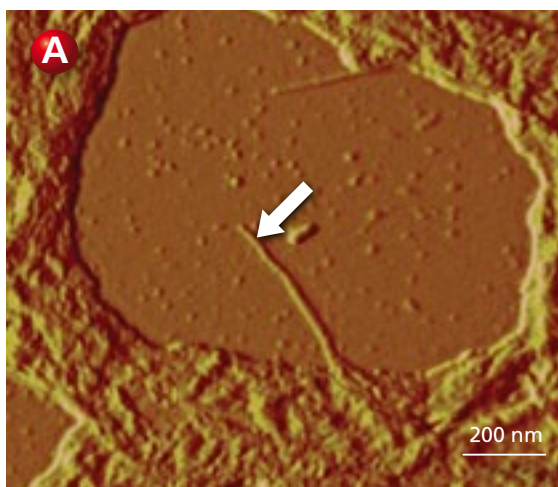
Mindst 27 sygdomme er blevet forbundet med tilstedeværelsen af trådagtige sammenfletninger af proteiner, som kaldes amyloide fibriller. Men det er ikke hele historien. Naturlige fibriller kan også være gavnlige, og ny forskning peger på, at syntetiske fibriller kan udnyttes medicinsk. Et depotpræparat til behandling af prostatakræft frigiver lægemiddelstoffet fra funktionelle fibriller, som dannes spontant efter injektion i underhuden.

Af Minna Grønning Jensen, Andreas van Maarschalkerweerd og Tine Gottschalk

Proteiner og korte proteinsekvenser – peptider – har tendens til at aggregere og kan bl.a. danne trådformede fibriller. Mest kendt er de amyloide fibriller, som ophobes i hjernen ved alvorlige neurodegenerative sygdomme som Alzheimers sygdom og Parkinsons sygdom, og som ligeledes spiller en rolle i type-2 diabetes. I de senere år har man imidlertid fået øjnene op for, at fibriller udfører vitale funktioner i bakteri-

er og svampe og endda i pattedyr, hvor de indgår i cellernes beskyttelse imod ultraviolet stråling. Det viser, at amyloid-lignende strukturer ikke nødvendigvis er patogene. Men at fibriller kan bruges til terapeutiske formål er helt nyt. Vores forskning sandsynliggør, at spontan dannelse af fibriller er mekanismen bag en forbedret behandling af prostatakræft, hvor lægemidlet frigives langsomt og kontrolleret fra et depot i underhuden.

Prostatakræft er den trediehyppigste kræftform blandt danske mænd over 50 år. Over 20.000 danskere lever med diagnosen, og hvert år opdages 3700 nye tilfælde. Dødeligheden inden for fem år efter diagnosticeringen er 32 procent, og sygdommen fører til omkring 1100 dødsfald om året. Behandlingsmetoderne omfatter operation, hvor prostata fjernes, stråleterapi, kirurgisk kastration samt medicinsk kastration. Ved medicinsk kastration anvender lægerne stoffer, som regulerer effekten af hormonet Gonadotropin udløsende hormon (GnRH), hvilket blokerer det mandlige kønshormon, testosteron. Den medicinske behandling kan ofte bremse sygdommens udvikling i en længere periode.



Depotlægemidlet degarelix til behandling af prostatakræft består af et peptid, som danner fibriller, når det i opløst form injiceres i underhuden. I laboratoriet er fibriller af degarelix blevet visualiseret ved hjælp af Atomic Force Mikroskopi **A**; en fibril er markeret med pilen. Tykkelsen af en fibril er 1,3 nm, men de små fibriller finder sammen i tykke fibre med diametre på op til 5-10 µm. Når farvestoffet Nil-rød binder sig til fibre, kan de ses med fluorescensmikroskopi **B**.

Ferring Pharmaceuticals A/S har udviklet lægemidlet degarelix, som er en GnRH-antagonist – dvs. et stof, som virker i prostata ved at blokkere cellernes GnRH-receptorer og dermed hæmme de signalprocesser, som hormonet normalt medierer. Lægemidlet blev godkendt af de amerikanske og europæiske lægemiddelmyndigheder til behandling af prostatakræft i 2008-2009. Selve lægemiddelstoffet er et syntetisk peptid, som danner funktionelle fibriller efter injektion i underhuden, hvor fibrillerne fungerer som et depot, der frigiver lægemiddelstoffet langsomt og kontrolleret.

Gode og onde fibriller

Formodenlig kan alle proteiner og peptider forme amyloide eller amyloidlignende fibriller. Disse yderst stabile fibriller måler typisk nogle få nanometer i diameter og op til flere mikrometer i længden. Den formelle definition på de sygdomsrelaterede amyloide fibriller er stadig til debat på internationalt plan

blandt feltets førende forskere. Men de fleste er enige om, at amyloide fibriller farvet med Congo-rød giver en æblegrøn dobbeltbrydning under polariseret lys, og at de er symmetrisk opbygget af en karakteristisk kryds- β -struktur. I denne struktur er peptidstrengene samlet i plader, hvori strengene ligger på tværs af fibrillernes længderetning som leddene i en lynlås, og pladerne er samlet i flere lag, som til sammen danner fibrillen. Mindst 27 sygdomme er til dato blevet forbundet med tilstedeværelsen af amyloide fibriller, som er opbygget af kroppens egne proteiner eller peptider. Meget tyder dog på, at de amyloide fibriller i sig selv er inaktive, og at de fungerer som et lager for giftstoffer, som dannes under fibrilleringsprocessen. Mens amyloide fibriller primært forbindes med sygdomme, så har forskerne i de seneste år fået øjnene op for, at en tilsvarende type fibriller udøver en række gavnlige funktioner i mange levende organismer. Blandt andet indgår amyloidlignende fibriller i mammale cells forsvar mod ultraviolet

DANNELSE AF FUNKTIONELLE FIBRILLER

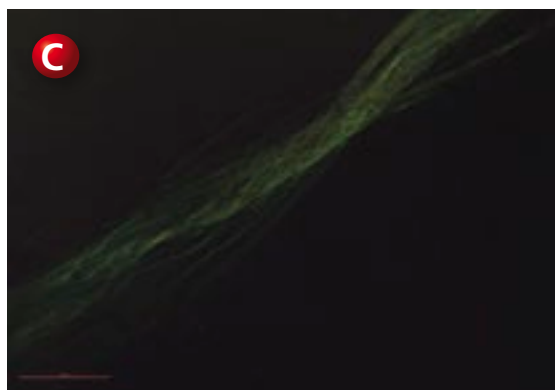
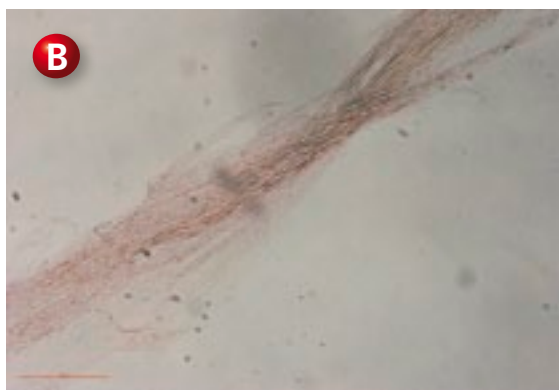
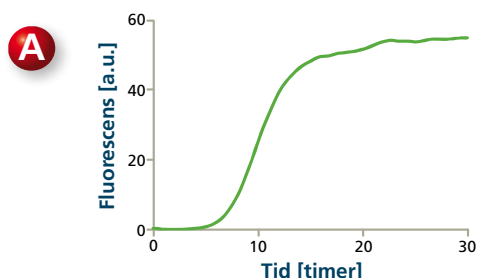
Fibriller er komplekse strukturer, og det er nødvendigt at anvende en bred vifte af metoder for at karakterisere dem. Vi har undersøgt de fibriller, som dannes af peptidlægemidlet degarelix, og sammenlignet resultaterne med kendt viden om amyloide fibriller.

Efter injektion i huden danner opløsningen med degarelix en gel, hvorfra det terapeutiske peptid frigives over tid. Tilsvarende geler kan fremstilles i laboratoriet, når degarelix opløses i vand, og vore undersøgelser viser, at disse geler består af amyloidlignende fibriller. For at fremskynde fibrilleringsprocessen blev degarelix rystet ved 37 °C svarende til den humane kropstemperatur.

De enkelte fibriller i gelen har en diameter på omkring 1,3 nanometer, og de kan visualiseres ved hjælp af Atomic Force Mikroskopi. Desuden anvendes farvestoffet Thioflavin T ofte til at følge dannelsen af fibrillerne. I denne sammenhæng

udnyttes det, at farvestoffet bliver fluorescerende, når det binder sig til fibriller.

Efter den umiddelbare fibrildannelse samles de små tynde fibriller spontant i tykke fibre med en diameter på 5-10 μm . Disse fibre er så store, at de kan observeres med fluorescensmikroskop, hvis fibre først farves med eksempelvis Nil-rød. Samlingen er atypisk for amyloide fibriller.



Degarelix-fibrillerne har mange amyloidlignende karakteristika. Overordnet følger fibrildannelsen et forløb, som er typisk for amyloide fibriller. Denne udvikling monitoreres ved at følge ændringerne i Thioflavin T fluorescens som funktion af tiden **A**. Et andet amyloid-lignende karakteristika fremkommer, når fibrillerne farves med Congo-rød **B**, hvorefter de fremstår æblegrønne, når de belyses med polariseret lys **C**.

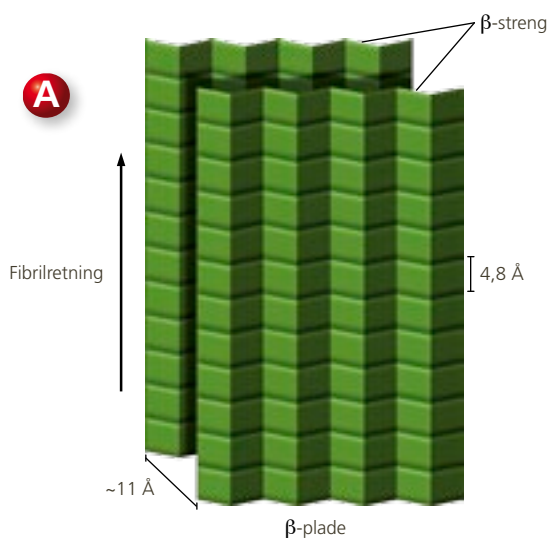
OPKLARING AF FIBRILLERNES INTERNE STRUKTUR

Et af de mest udprægede fysisk-kemiske karakteristika ved amyloide fibriller er deres interne opbygning af plader, der er dannet af peptidstrengene orienteret på tværs af fibrillens længderetning. Denne særlige struktur kan identificeres ved at farve fibrillerne med Congo-rød, hvilket giver en æblegrøn dobbeltbrydning under polariseret lys.

Strukturen kan undersøges nøjere med en metode, der hedder røntgen-fiberdiffraktion. Inden undersøgelsen tørres fibrillerne med en speciel teknik, hvorved de orienterer sig parallelt. Når en røntgenstråle derpå sendes gennem fibrillerne,

spredes den i et bestemt mønster, som afslører afstandene mellem β -strengene og mellem β -plader.

Amyloide fibriller udviser typisk signaler ved 4,8 Å, hvilket svarer til afstanden mellem strengene inde i pladerne, og omkring 10-11 Å, hvilket svarer til den indbyrdes afstand mellem pladerne i fibrillen. I degarelixfibrillerne genkendes dette klassiske mønster, men derudover fremkommer der større indbyrdes afstande på omkring 13, 22,5 og 25,9 Å, hvilket fint kan stemme overens med, at de tynde degarelix-fibriller går sammen og danner tykkere fibre.



Amyloide fibriller er opbygget af kryds- β -plader, i hvilke peptidstrengene er orienteret på tværs af fibrillernes længderetning med en indbyrdes afstand på 4,8 Å, mens afstanden mellem pladerne i fibrillen er 10-11 Å **A**. Vore forsøg med røntgen-fiberdiffraktion viser, at degarelixfibrillerne overordnet set har samme karakteristiske afstande, hvilket ses i diffraktionsmønstret **B**.

stråling, og de medvirker til bakteriers frigivelse af sporer. De nye funktionelle fibriller til medicinsk brug har slående strukturelle ligheder med både de skadelige amyloide fibriller og de nyttige amyloidlignende fibriller, og det sandsynliggør, at funktionelle fibriller har et medicinsk potentiale, som rækker langt ud over at være et farligt fænomen, som for enhver pris skal undgås.

Funktionelle fibriller mod prostatakræft

Lægemidlet degarelix er en GnRH-antagonist, som anvendes til behandling af prostatakræft. Aktivstoffet er et lineært syntetisk peptid, som består af ti aminosyrer, og lægemidlet fremstilles som et frysetørret, hvidt præparat. Inden brugen opløses præparatet, hvorpå det injiceres i underhuden. Her dannes der spontant en gel ved mødet med det omgivende miljø som følge af blandt andet pH-værdien, ionstyrken og kropstemperaturen. Når gelen er dannet, afgives peptidet langsomt til

blodkredsløbet, hvorved der opnås en depoteffekt.

Gelen består sandsynligvis af fibriller med amyloidlignende karakteristika. Denne anvendelse af funktionelle fibriller er ganske unik, og derfor er det interessant at undersøge nærmere, hvor mange fællestræk disse fibriller har med amyloide fibriller. Vore undersøgelser bekræfter, at degarelix i laboratorieforsøg er i stand til at danne amyloidlignende fibriller, og at disse fibriller derpå samles i større netværk. Peptidet danner også et tæt netværk af fibriller ved injektion i mennesker, men om det sker på helt samme måde som i laboratorieforsøgene, er stadig ved at blive undersøgt. Både laboratorieforsøg og dyreforsøg viser, at et syntetisk, unaturligt peptid med terapeutisk effekt kan danne funktionelle fibriller med amyloide karakteristika. At der eksisterer funktionelle fibriller, som kan anvendes i terapeutisk øjemed, er noget helt nyt, som åbner nye døre for fremtidig medicinsk brug af disse strukturer.

Ph.d. Minna Grønning Jensen er postdoc på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Cand.pharm. Andreas van Maarschalkerveerd er ph.d.-studerende på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning
Ph.d. Tine Gottschalk er seniorforsker på Ferring Pharmaceuticals A/S